



**REPÚBLICA DE CHILE  
SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA  
FOMENTO Y RECONSTRUCCIÓN  
DEPTO. DE PROPIEDAD INDUSTRIAL**

 <p>REPÚBLICA DE CHILE SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA FOMENTO Y RECONSTRUCCIÓN DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL</p>																																																									
<p>1) TIPO DE SOLICITUD</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> AMPLIACION DEL PLAZO <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE</p>				<p>11) NÚMERO DEL DOCUMENTO 39483</p>																																																					
<p>2) NÚMERO DE SOLICITUD 858-91</p>																																																									
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">RESOLUCIÓN</td> <td colspan="2">FECHA SOLICITUD</td> <td colspan="2">PLAZO SOLICITADO</td> <td colspan="2">PUBLICACIÓN</td> <td colspan="2">CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL</td> </tr> <tr> <td colspan="2">NO.</td> <td colspan="2">DIA MES AÑO</td> <td colspan="2">15 años</td> <td colspan="2">DIA MES AÑO</td> <td colspan="2">ESTADO</td> </tr> <tr> <td colspan="2">NO REIVINDICACIONES</td> <td colspan="2">DIA MES AÑO</td> <td colspan="2">PLAZO CONCEDIDO</td> <td colspan="2">DIA MES AÑO</td> <td colspan="2"><input checked="" type="checkbox"/> CONCEDIDA</td> </tr> <tr> <td colspan="2">HOJAS ACCUITADAS</td> <td colspan="2">DIA MES AÑO</td> <td colspan="2">DIAS MESES AÑOS</td> <td colspan="2">DIA MES AÑO</td> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> EN TRAMITE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PERITOS EXAMINADORES</td> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>								RESOLUCIÓN		FECHA SOLICITUD		PLAZO SOLICITADO		PUBLICACIÓN		CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL		NO.		DIA MES AÑO		15 años		DIA MES AÑO		ESTADO		NO REIVINDICACIONES		DIA MES AÑO		PLAZO CONCEDIDO		DIA MES AÑO		<input checked="" type="checkbox"/> CONCEDIDA		HOJAS ACCUITADAS		DIA MES AÑO		DIAS MESES AÑOS		DIA MES AÑO		<input type="checkbox"/> EN TRAMITE		PERITOS EXAMINADORES									
RESOLUCIÓN		FECHA SOLICITUD		PLAZO SOLICITADO		PUBLICACIÓN		CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL																																																	
NO.		DIA MES AÑO		15 años		DIA MES AÑO		ESTADO																																																	
NO REIVINDICACIONES		DIA MES AÑO		PLAZO CONCEDIDO		DIA MES AÑO		<input checked="" type="checkbox"/> CONCEDIDA																																																	
HOJAS ACCUITADAS		DIA MES AÑO		DIAS MESES AÑOS		DIA MES AÑO		<input type="checkbox"/> EN TRAMITE																																																	
PERITOS EXAMINADORES																																																									
<p>5a) TÍTULO DEL DOCUMENTO</p> <p>"Composición enzimática que puede ser incorporada a una masa para mejorar la blandura y retardar el envejecimiento de los alimentos horneados."</p>																																																									
<p>6) ANTERIORIDAD</p> <table border="1"> <tr> <td colspan="2">TIPO</td> <td colspan="2">ESTADO</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION</td> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> CONCEDIDA</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> MODELO INDUSTRIAL</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> EN TRAMITE</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>								TIPO		ESTADO		<input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION		<input type="checkbox"/> CONCEDIDA		<input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL				<input type="checkbox"/> MODELO INDUSTRIAL				<input type="checkbox"/> EN TRAMITE																																	
TIPO		ESTADO																																																							
<input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCION		<input type="checkbox"/> CONCEDIDA																																																							
<input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL																																																									
<input type="checkbox"/> MODELO INDUSTRIAL																																																									
<input type="checkbox"/> EN TRAMITE																																																									
<p>7) NÚMERO 581,290</p>																																																									
<p>8) PAÍS: EE.UU. DE A.</p>																																																									
<p>9) FECHA: Septiembre 12, 1990</p>																																																									
<p>10) DIA MES AÑO</p>																																																									
<p>11) DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS</p> <table border="1"> <tr> <td colspan="2"><input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN DEL INVENCION</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA EXPLICATIVA</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> PODER</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> CESIÓN</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><input type="checkbox"/> PROTOTIPO</td> </tr> </table>								<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN DEL INVENCION		<input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA EXPLICATIVA		<input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES		<input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS		<input type="checkbox"/> PODER		<input type="checkbox"/> CESIÓN		<input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD		<input type="checkbox"/> PROTOTIPO																																			
<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN DEL INVENCION																																																									
<input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA EXPLICATIVA																																																									
<input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES																																																									
<input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS																																																									
<input type="checkbox"/> PODER																																																									
<input type="checkbox"/> CESIÓN																																																									
<input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD																																																									
<input type="checkbox"/> PROTOTIPO																																																									
<p>12) SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAÍS, TELÉFONO)</p> <p>ENZYME BIO-SYSTEMS LTD., sociedad organizada bajo las leyes del Estado de Delaware, domiciliada en International Plaza, P.O. Box 8000, Englewood Cliffs, New Jersey 07632, Estados Unidos de América.</p>																																																									
<p>13) INVENTOR O CREADOR (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - NACIONALIDAD)</p> <p>Linda K. Bowles, norteamericana.</p>																																																									
<p>14) REPRESENTANTE: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELÉFONO)</p> <p>Federico Villaseca Ossa y/o Sergio Villaseca Ossa y/o Sergio Amenábar Villaseca y/o Bernardo Serrano Spoerer y/o Max F. Villaseca Molina, domiciliados en Avda. Providencia 329, 6º Piso, Santiago, Chile. Teléfono 491395.</p>																																																									
<p>15) DECLARO/ DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO OSCURO SON VERDADEROS Y TAMBIÉN CONOCER EL ART. [ ] DEL DECRETO LEY N° 858 DEL AÑO 1931 (ART. 18 DEL DECRETO LEY N° 858 DEL AÑO 1931) Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL</p>																																																									
<p>RECEPCION</p> <p>12 SET 1990</p> <p>SERGIO VILLASECA OSSA</p> <p>1.922.620 - 4</p> <p>FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE</p>																																																									

## HOJA TÉCNICA

B58-91

(19) País CHILE

(21) N° de solicitud:

(12) Tipo de Solicitud

 Invención (A) Precaucional (Pr) Primaria (I) Modelo de Utilidad (U) Adicional (2)  
(Perfeccionamiento)  
a la patente N°: Reválida (R)

(72) Inventor: Linda K. Bowles, norteamericana.

(11) N° de patente:

3948

(74) Agente: SERGIO VILLASECA OS.  
ESTUDIO FEDERICO VILLASEC

(19) CL	(12)	(11) Disp.	D	M	A	(51) CIP 4
(21)		(22) Sol.	12	09	91	
(11)		(24) Vig.				
(30)	<input checked="" type="checkbox"/> Anterioridad (Prioridad)	<input type="checkbox"/> Reválida	D	M	A	
	País N° USSN 581,290	S	12	09	90	

(71) Solicitante: ENZYME BIO-SYSTEMS LTD., sociedad organizada País EE.UU. DE A.  
bajo las leyes del Estado de Delaware.Dirección: International Plaza, P.O. Box 8000, Englewood Cliffs, New Jersey  
07632.

(51) Título: "Composición enzimática que puede ser incorporada a una masa para mejorar la blandura y retardar el envejecimiento de los alimentos horneados."

(57) Resumen, palabras clave y dibujo o fórmula:

Una composición enzimática compuesta por una enzima alfa-amilasa fúngica ácidoestable y una enzima alfa-amilasa bacterial retarda el endurecimiento de productos horneados a niveles de bajas dosis sin afectar adversamente las características organolépticas de las mercaderías horneadas y sin gomosidad significativa. La composición se puede agregar a la masa o esponja en el proceso de fabricación de productos de panadería. La enzima alfa-amilasa fúngica ácidoestable tiene una actividad óptima a un pH de cerca de 3,0 a cerca de 5,0 a una temperatura de cerca de 60 a cerca de 75°C, y la enzima alfa-amilasa bacterial tiene una actividad óptima a un pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0 a una temperatura de cerca de 100 a cerca de 110°C. La proporción de la enzima ácidoestable a la enzima bacterial en unidades por gramo de harina es de cerca de 0,05:0,005 a cerca de 1,0:0,1.

Documentos citados:

INSTITUTO FEDERAL INDUSTRIAL

-1-

02

MEMORIA EXPLICATIVA

39483

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Alcance de la invención

Esta invención se refiere al uso de ciertas composiciones de enzimas que pueden ser incorporadas a una masa o esponja para mejorar la blandura y retardar el envejecimiento de los alimentos horneados.

Descripción de inventos relacionados

El fenómeno del endurecimiento del pan no se conoce completamente. El endurecimiento del pan está relacionado generalmente a la retrogradación del almidón, o a la asociación de las moléculas del almidón para formar zonas de cristalinidad que resultan en un aumento de la dureza del pan con el pasaje del tiempo. El envejecimiento es de considerable importancia económica para las panaderías mayoristas ya que limita el tiempo de almacenamiento en el estante de las mercaderías en los negocios minoristas a alrededor de 3 o 4 días, además de varios días adicionales en el hogar del consumidor después de la compra. La brevedad del almacenamiento admisible en el estante de las mercaderías horneadas ha requerido que las panaderías al por mayor tengan sistemas separados de distribución que operen independientemente de los canales usuales de la distribución de mercaderías empacadas. Además, el área comercial de una panadería está generalmente limitada por el radio máximo que el sistema de distribución puede abarcar en 24 horas.

03

-2-

Los químicos cerealistas y los técnicos panaderos han descubierto que 3948 existen varios emulsificadores químicos que tiene alguna influencia en la extensión del almacenamiento en estante de las mercaderías horneadas, tales como el pan. Sin embargo, los emulsificadores químicos son sólo parcialmente eficaces en reducir el endurecimiento del pan. Se han agregado monoglicéridos y otros emulsificadores al pan para mejorar su blandura. Aunque estos emulsificadores producen un pan más blando, tienen poca influencia en reducir la rapidez con la que el pan se endurece. El término "mercaderías horneadas" también connota aplicación a tales productos como bollos, panecillos, bizcochos, buñuelos, galletas y tortas.

Se han utilizado enzimas de varios tipos en la cocción de alimentos y algunas han sido utilizadas con el propósito específico de inhibir el endurecimiento.

La enzima de cereal alfa-amilasa en forma de cebada malteada se agrega comúnmente a la harina de trigo para pan con el fin de normalizar su comportamiento en el horneado. La alfa-amilasa de cereal es más activa a un pH de cerca de 6 y a una temperatura de alrededor de 70 a 75°C.

La enzima "alfa-amilasa hongosa" como se la conoce en las industrias panaderas y de enzimas, se relaciona generalmente a enzimas hechas de Aspergillus oryzae, y puede también utilizarse para normalizar el desempeño del horneado. La enzima es más activa a un pH de cerca de 6 y a una temperatura de aproximadamente de 50 a 55°C.

La enzima "alfa-amilasa bacterial", como el término es utilizado en las industrias panaderas y de enzimas, se refiere más a menudo a las enzimas hechas de Bacillus subtilis, que son utilizadas para inhibir el

(4)

-3-

3948

envejecimiento. La enzima es más activa a un pH de cerca de 7 a una temperatura de aproximadamente 75 a 80°C.

La solicitud de patente U.S. Serie No. 07/419,980, presentada el 11 octubre de 1989, describe una enzima alfa-amilasa fúngica ácida estable que puede derivarse de un hongo pero que es distinta de las alfa-amilasas de cereal, hongosa y bacterial mencionadas anteriormente. Tiene una actividad máxima a un pH de cerca de 3,0 a 5,0 y a una temperatura de aproximadamente 60 a 75°C. Esta es una de las enzimas utilizadas en la composición de enzimas de la presente invención.

Un método enzimático para retardar el endurecimiento del pan se declara en la patente U.S. No. 2,615,810 de Stone e involucra el uso de una enzima alfa-amilasa bacterial térmicamente estable para atacar los gránulos de almidón gelatinizados durante el horneado.

Un refinamiento del método Stone se describe en la patente U.S. No. 4,299,848 de DeStefanis *et al*, que declara un proceso para la inactivación de las enzimas proteolíticas presentes en las preparaciones de enzimas de alfa-amilasa bacterial térmicamente estables obtenidas de extractos de Bacillus subtilis, Bacillus steroothermophilis u otras fuentes microbiales.

Un refinamiento adicional está dado en la patente U.S. No. 4,654,216 de Carroll *et al*, que declara el uso de una amilasa bacterial térmicamente estable en conjunto con pululanasa para contrarrestar los problemas de los métodos de Stone y de DeStefanis *et al*. Carroll *et al* además declara que en el oficio panadero generalmente se clasifica a las alfa-amilasas de acuerdo a su origen, como bacterial, hongosa y cereal, también observando que las amilasas hongosas exhiben relativamente baja estabilidad térmica y se

05

-4-

33/28

desactivan relativamente con rapidez por encima de 65°C. Es así que las amilasas hongosas no están contempladas para la práctica de la invención de Carroll et al, que comprende la adición de una mezcla de enzimas de alfa-amilasas cereal o bacterial y una pululanasa a la masa, en proporciones de 0,25 a 5 SKB (unidades de alfa-amilasa) y 5 a 75 PUN (unidades de enzima desramificadora) por 100 gramos de harina.

Un inconveniente de los métodos de Stone, DeStefanis et al y Carroll et al es la tendencia de las alfa-amilasas bacteriales y cereales térmicamente estables de permanecer activas demasiado tiempo durante el horneado y de causar gomosidad en el producto terminado. Como resultado, estos métodos requieren un grado de control de las dosis y de las relaciones de las enzimas que puede ser comercialmente impráctico.

La patente U.S. 4,320,151 de Cole declara que la estabilidad térmica de una alfa-amilasa hongosa aumenta substancialmente dispersando soluciones acuosas de la enzima en soluciones azucaradas concentradas. La enzima alfa-amilasa hongosa protegida con azúcar sobrevive la incorporación en la masa y permanece activa hasta que se alcanza la temperatura a la cual ocurre la gelatinización de almidón. Es así que las soluciones de alfa-amilasa hongosa protegidas con azúcar retienen su actividad hidrolizadora del almidón, aún cuando se calienten a temperaturas muy por encima de aquellas a las cuales la enzima debería ser completamente desnaturalizada. Sin embargo, los cambios de procesos e ingredientes requeridos hacen a este método inapropiado para un número de aplicaciones de panadería.

La patente rusa 659,617 declara la producción de una cepa de microorganismos de la cual se obtiene alfa-amilasa resistente a los ácidos y

-5-

06

39483

enzimas glucoamilasa. La cepa, Aspergillus niger 147-A, se obtiene tratando Aspergillus niger 475 con radiación ultravioleta. En un ejemplo de esta patente, se horneó pan utilizando una preparación de enzima alfa-amilasa resistente a los ácidos y glucoamilasa de A. niger 147-A, y el resultado fue un proceso de endurecimiento más lento. La alfa-amilasa es el producto de una cepa mutante de A. niger, que no se encuentra directamente en la naturaleza, y la alfa-amilasa resistente a los ácidos producida a partir de A. niger 147-A pierde irreversiblemente su actividad a un pH de 3.0.

La patente canadiense No. 880,703 de Grampp *et al* declara una alfa-amilasa bacterial termolábil que no tiende a crear el problema de gomosidad de las alfa-amilasas bacteriales comunes. Sin embargo, esta enzima no es suficientemente termoestable para inhibir el endurecimiento y no es ácidoestable.

La patente Vidal U.S. 4,160,848 declara una composición antiendurecedora que contiene una combinación de un éster de glicerina y un ácido graso y otra de ácidos grasos substituidos y no substituidos que se combinan preferiblemente con una enzima seleccionada de alfa-amilasa, amiloglucosidasa y lipasa derivada de moho. Se declaran como ejemplo las alfa-amilasas derivadas de Aspergillus oryzae. La referencia declara la adición de la composición a la masa o esponja.

G. Bussiere *et al* en "La utilización de alfa-amilasa y glucoamilasa en la tecnología de panadería industrial", Annales de technologie agricole, volumen 23 (2), págs. 175 a 189 (1974), declara estudios sobre la función de las alfa-amilasas de origen bacterial y la glucoamilasa en la tecnología de

07

39483

-6-

la fabricación del pan. Esta referencia enseña que sólo las alfa-amilasas de origen bacterial son efectivas para retardar el endurecimiento.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está basada en el descubrimiento de que las combinaciones de ciertas enzimas alfa-amilasas microbiales ácidoestables que han sido derivadas de un hongo, con ciertas enzimas de alfa-amilasa bacterial permiten sacar ventaja de las propiedades deseables de ambas enzimas al mismo tiempo que se evitan algunas de sus desventajas. Se ha también encontrado que la combinación de enzimas es efectiva en retardar el endurecimiento con una dosis total de enzimas inferior a la requerida por cualquiera de esas enzimas por sí misma. Esto puede resultar en un significativo ahorro para el panadero, particularmente en vista del relativamente alto costo de las enzimas hongosas. La composición de la enzima de la invención retarda el endurecimiento de las mercaderías horneadas sin afectar adversamente las características organolépticas de dichas mercaderías. La gomosidad que se relaciona normalmente con el uso de composiciones enzimáticas antiendurecedoras también se minimiza debido a las bajas dosis utilizada de acuerdo a la invención.

Más específicamente, la presente invención provee un proceso para la fabricación de productos horneados que tengan resistencia al endurecimiento agregando a la masa o esponja una enzima alfa-amilasa fúngica ácidoestable y una enzima alfa-amilasa bacterial, donde la enzima fúngica tiene una actividad óptima a un pH de cerca de 3,0 a cerca de 5,0 a temperaturas de aproximadamente 60 a cerca de 75°C, y la enzima bacterial tiene una

-7-

08

39483

actividad óptima a un pH de aproximadamente 5,0 a cerca de 7,0 a temperaturas aproximadas de 100 a 110°C.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra gráficamente el resultado de los ensayos de firmeza de la miga tomados de la Tabla 1 en el Ejemplo 1, que se explica más adelante en esta especificación.

La Figura 2 ilustra gráficamente el resultado de los ensayos de firmeza de la miga tomados de la Tabla 3 en el Ejemplo 2, que se explica más adelante en esta especificación.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que la composición de enzimas retarda el endurecimiento de las mercaderías horneadas sin afectar adversamente las propiedades organolépticas de dichas mercaderías y sin gomosidad significativa.

Las mercaderías horneadas que mejoraron sus propiedades antiendurecedoras de acuerdo con esta invención incluyen panes, panecillos, bizcochos, rosas de pan; y similares; pasteles, tortas y otros productos horneados,

La enzima ácidoestable utilizada en la composición de esta invención tiene una actividad óptima a un pH de cerca de 3 a cerca de 5, preferiblemente alrededor de 3,5 a cerca de 4,5, a temperaturas de aproximadamente 50 a cerca 75°C, preferiblemente alrededor de 65 a 70°C. La enzima sobrevive la

-8-

60

39483

incorporación en una masa y permanece activa a temperaturas superiores de cerca de 60°C donde ocurre la gelatinización del almidón, sin necesidad de la protección de azúcar como se declara en la patente U.S. 4,320,151 de Cole. A temperaturas superiores a los 70°C, que ocurren posteriormente durante el proceso de horneado, la enzima está completamente inactivada y de este modo no tiene tendencia a hidrolizar excesivamente el almidón y causar gomosidad en el producto terminado.

La enzima ácidoestable puede derivarse de un hongo, tal como el Aspergilli negro. Ejemplos del Aspergilli negro incluyen Aspergillus awamori, Aspergillus usami, Aspergillus niger, Aspergillus saitoi, Aspergillus inui, Aspergillus aureus y Aspergillus nakazawai. Una enzima ácidoestable apropiada para esta aplicación es la carbohidrasa de hornear MULTIFRESH(R) que se consigue en Enzyme Bio-Systems Ltd., Sylvan Avenue, Englewood Cliffs, Nueva Jersey 07632 E.U.A.

Es comúnmente sabido que el Aspergilli antes mencionado también produce una enzima glucoamilasa como también una enzima alfa-amilasa que pierde su actividad en condiciones ácidas. En 1963, Y. Minoda et al, informaron que cuando los Aspergilli negros eran cultivados en condiciones apropiadas, podían también producir una enzima alfa-amilasa ácidoestable que mostrara actividad dextrinizadora aún después de un tratamiento ácido a un pH de 2,5 a 37°C durante 30 minutos (Agr. Biol. Chem., Volumen 27, No. 11, págs. 806 a 811, 1963 (parte 1); Volumen 32, No. 1, págs. 104 a 109, 1968 (parte 2); Volumen 32, No. 1, págs. 110 to 113 (parte 3). Los métodos para producir alfa-amilasas ácidoestables mediante el cultivo de diferentes Aspergilli negros se declaran en la solicitud de patente europea 138,428 de Heidt-Hanson

-9-

10

39483

et al y en la patente canadiense 663,274 de Yamada et al.

Las propiedades de la alfa-amilasa ácidoestable en varias especies de Aspergilli negros han recibido amplia atención y estudio, por ejemplo, G. K. Kvesitadze et al, "Acid-Stable and Acid-Labile Alpha Amylases of Mold, fungi Aspergillus", BIOCHEMISTRY USSR, 43 (9) parte 2, págs. 1330 to 1336 (1978); Y. Minoda et al, "La estructura y la función de alfa-amilasa ácidoestable de Aspergilli negros", DENPUN KAGAKU (publicación de la Sociedad Japonesa de Ciencias del Almidón, Volumen 21, No. 3, págs. 172 a 189 (1974); L. B. Wingard Jr. et al, editor, "Bioquímica y bioingeniería aplicadas", volumen 2 - Tecnología de enzimas, pág. 61 (Academic Press 1979); T. T. Hansen, "Posibilidades de la aplicación industrial de una alfa-amilasa ácidoestable de Aspergillus niger", NUEVOS METODOS SOBRE LA INVESTIGACION DE CARBOHIDRATOS DE CEREALES, págs. 211 a 216 (Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985).

La solicitud de patente europea 140,410 de Ducroo et al, declara el aislamiento de una amilasa ácida fúngica de la amiloglucosidasa, preferiblemente Aspergillus niger. La amilasa ácida produce la óptima sacarificación a un pH entre 3,5 y 5,0 a temperaturas de cerca de 60 a 75°C y es estable durante un período de varios meses en condiciones ordinarias de almacenamiento.

La actividad de la enzima ácidoestable está determinada por el siguiente método de ensayo interactivo. Se prepara una solución acuosa de la alfa-amilasa ácidoestable que contenga una cantidad estimada de 0,04 a 0,10 unidades de la alfa-amilasa (AU) por mililitro (ml). Un ml de solución de enzima se agrega a 4,0 ml de una solución de almidón al 1,25% a 60°C contenido 0,125 Moles (M) de un amortiguador de acetato de pH de 5,8.

-11-

12

39483

La enzima bacterial utilizada en la composición de la presente invención tiene una actividad óptima a un pH de cerca de 5 a cerca de 7 a temperaturas desde unos 100 a unos 110°C. Esta enzima puede ser derivada del Bacillus stearothermophilus. Una enzima bacterial apropiada para esta aplicación es la G-ZYMER G995 disponible de Enzyme Bio-Systems Ltd., Sylvan Avenue, Englewood Cliffs, Nueva Jersey 07632 E.U.A.

La actividad de la enzima bacterial está determinada por el siguiente procedimiento.

Se deja a la enzima reaccionar con una disolución normal de almidón en condiciones controladas. La actividad de la enzima se determina por el grado de hidrólisis del almidón, según se refleja en un decrecimiento de la capacidad de la mancha de iodo, que se mide espectrofotométricamente. La unidad de la actividad de la alfa-amilasa bacterial es la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 10 miligramos de almidón por minuto en las condiciones del procedimiento.

Se disuelve de 0,3 a 0,5 gramos de muestra sólida o de 0,3 a 1,0 mililitros de una muestra líquida, en una cantidad suficiente de cloruro de calcio acuoso de 0,0025 Moles para producir una solución enzimática que contenga aproximadamente 0,25 unidades de actividad por mililitro.

Una mezcla de 10 mililitros de una solución de almidón soluble de 1%, equilibrada a 60°C, y 1 mililitro de la muestra de enzima que quiera probarse, se mezcla y se mantiene en un baño a una temperatura constante

-10-

11

39483

Después de exactamente 3 minutos, se saca una parte alícuota de 1,0 ml de la mezcla de reacción, y se agrega inmediatamente a 3,0 ml de una solución de iodo de 0,100%, y diluido a 100 ml con agua destilada. La solución de iodo se prepara agregando 2,0 ml de una solución de iodo al 5,00% (10 gramos de ioduro de potasio más 5,00 gramos de iodo resublimado diluido en 100 ml con agua destilada) a 4 ml de 5M de ácido acético y diluida a 100 ml con agua destilada. Una segunda parte alícuota de 1,0 ml se saca a exactamente 13 minutos de la mezcla de reacción y se trata como se indicó anteriormente. Se determina la absorbancia de cada muestra a 650 nanómetros (nm) en una celda de 1 centímetro. La actividad se calcula de la manera siguiente:

$$AU/(\text{ml o gramo}) = 0,2303 \log \left( \frac{\text{Absorbancia, 3 min}}{\text{Absorbancia, 13 min}} \right) DF$$

donde DF = factor de dilución utilizado en preparar la enzima diluida, determinada dividiendo el volumen final de la muestra de la enzima diluida por el peso en gramos de la muestra de enzima inicialmente agregada. A continuación se dan algunos ejemplos:

#### Actividad estimada

(unidades alfa-amilasa

por ml o gramo

Diluir

Factor de

dilución (DF)

0,1 o menos	----	1
0,11 a 0,25	40 a 100 ml	2,5
0,26 a 0,50	20 a 100 ml	5
0,51 a 1,0	10 a 100 ml	10
1,1 a 2,5	40 a 1000 ml	25
2,6 a 5,0	20 a 1000 ml	50
5,1 a 10,0	10 a 1000 ml	100

X

2

-12-

13

de 60°C por exactamente 10 minutos. Se saca una muestra de 1 mililitro y se agrega una mezcla de 1 mililitro de ácido clorhídrico acuoso de 1 Mol y cerca de 50 mililitros de agua destilada. La capacidad de la mancha de iodo de una muestra acidificada se determina luego al agregar 3,0 mililitros de una solución de 0.05% de iodo, diluyendo hasta 100 mililitros con agua destilada y mezclándolo bien. La absorbancia de la solución, relativa a la del agua destilada, se mide a 620 nanómetros, en una celda de 2 centímetros. Se hace una medición similar de la solución normal de almidón (a la cual se agregó agua en lugar de la solución enzimática) para proveer una absorbancia en blanco.

La actividad enzimática, en unidades/gramo o /mililitros es igual a  
(Absorbancia en blanco - Absorbancia de la muestra) X DF X 50

Absorbancia en Blanco X 10 X 10

En la ejecución de la invención, las composiciones enzimáticas se emplean como añadiduras a la harina utilizada para hornear. Las relaciones de las dosis relativas de la enzima ácidoestable a la enzima bacterial son de cerca de 0,05:0,005 de unidades de alfa-amilasa por gramo de harina, a cerca de 1,0:0,1 unidades de alfa-amilasa por gramo de harina. Las relaciones preferidas son de cerca de 0,1:0,01 de unidades de alfa-amilasa por gramo de harina, a cerca de 0,5:0,05 de unidades de alfa-amilasa por gramo de harina. El peso de la harina se refiere al total de la harina utilizada para hacer el producto horneado. Así, cuando se utiliza una esponja, el peso de la harina en ella se agrega al peso de la harina en la masa y la suma se utiliza como el denominador para calcular las unidades de alfa-amilasa por gramo de harina.

-13-

14

La composición enzimática de la presente invención puede prepararse mezclando la enzima ácidoestable con la enzima bacterial previamente a emplearlas en el proceso de horneado, o ellas pueden agregarse individualmente en la relación deseada a un ingrediente utilizado en el proceso de horneado. La composición comprende la enzima alfa-amilasa fúngica ácidoestable y la enzima alfa-amilasa bacterial en una proporción de cerca de 5 a cerca de 100 unidades de alfa-amilasa en la enzima ácidoestable, a cerca de 0,5 a cerca de 10 unidades alfa-amilasa de la enzima bacterial.

La composición enzimática, o sus componentes de enzima, pueden emplearse como una solución acuosa concentrada o en forma sólida. En el proceso de horneado, la composición enzimática, o sus componentes de enzima, pueden agregarse a cualquier ingrediente de la esponja o masa, tal como harina, levadura o agua, o pueden agregarse después de todos los otros ingredientes durante la operación de mezclado.

Las mercaderías horneadas preparadas que utilizan la composición de la presente invención exhiben excelentes propiedades antiendurecedoras con niveles de la dosis de enzima inferiores a los generalmente utilizados en el oficio. Los productos horneados permanecen blandos por más tiempo, según las pruebas de firmeza de miga descritas en los ejemplos establecidos en esta especificación.

Otro beneficio de la enzima es su habilidad de reducir o eliminar la adición de otros ingredientes como acondicionadores, por ejemplo lactato estearílico sódico, y agentes ablandadores como monoglicéridos, diglicéridos y otros emulsificadores.

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones específicas de esta

-14-

15

invención. En estos ejemplos y en todas las especificaciones, todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario. 39483

## EJEMPLO 1

Las enzimas fueron probadas en un laboratorio de ensayo panadero comercial utilizando un proceso de esponja y masa. Se utilizó la siguiente fórmula:

	<u>INGREDIENTES</u>	<u>Peso (g)</u>
Esponja	Harina de pan (11,5% de proteína)	2100
	Alimento de levadura mineral (bromado)	3
	Lactato estearílico sódico	11,2
	Levadura comprimida	75
	Agua	1260
Masa	Harina de pan	900
	Leche seca desgrasada	60
	Sal	60
	Propionato de calcio	3
	Aceite de soya	60
	Ablandador de migas (GMS-90)	30
	Jarabe de maíz de alta fructuosa de 42%	255
	Aqua y hielo	466

-15-

16

Los ingredientes de la esponja fueron mezclados y se dejaron fermentar por 3,5 horas (la temperatura final fue de 84°C). Los ingredientes de la masa fueron agregados y la masa pesó 526 g/pan. Los panes se dejaron elevar hasta una altura de 100 +/- 1 milímetro con anterioridad al horneado a 435°F durante 18 minutos. Los panes fueron enfriados durante una hora a temperatura ambiente y embolsados para almacenamiento. (El ablandador de miga GMS-90 es un monoglicérido hidratado que se obtiene de Breddo Inc., Kansas City, Missouri, EUA).

Al día siguiente del horneado se rebanaron mecánicamente tres panes para evaluar sus cualidades externas, internas y comestibles. Se midió la firmeza de la miga con un aparato de ensayo de alimentos Instron de acuerdo a la Asociación Americana de Químicos Cerealistas, Método 74-09. La firmeza de la miga se especificó en gramos de fuerza requeridos para comprimir 6,2 milímetros dos rebanadas de pan con un disco plano de 36 milímetros de diámetro a un régimen de compresión de 100 milímetros por minuto. Las mediciones de la firmeza de la miga se repitieron en el cuarto y el séptimo día después del horneado.

Las enzimas fueron obtenidas de Enzyme Bio-Systems Ltd., Englewood Cliffs, Nueva Jersey, EUA. Las enzimas probadas fueron una preparación de alfa-amilasa bacterial de Bacillus stearothermophilus, y una preparación de alfa-amilasa hongosa derivada de Aspergillus niger. La amilasa bacterial se vende como alfa-amilasa G-Zyme® G995 y la alfa-amilasa hongosa se vende como Multifresh® alfa-amilasa. Las enzimas líquidas fueron agregadas con los

-16-

17

39483

ingredientes de la esponja. La Tabla 1 y Figura 1 indican que la adición de muy bajos niveles de la alfa-amilasa bacterial fue en sí misma ineficaz para reducir el aumento de la firmeza del pan. Cuando este nivel de enzima bacterial fue incluido con bajos niveles de alfa-amilasa hongosa, la reducción del aumento de la firmeza del pan fue mayor que con cualquiera de las enzimas solas, y comparable a la que se obtiene con una relación cuatro veces mayor de una adición de alfa-amilasa hongosa.

## CUADRO 1

Encima u.enzima/g total de harina a-amilasa hongosa a-amilasa bacterial		Firmeza de la miga Días después del horneado		
		Día 1	Día 4	Día 7
1,1	0	126+/-2	193+/-4	236+/-4
0,27	0	143+/-4	199+/-3	284+/-6
0,27	0,02	124+/-2	174+/-4	254+/-3
0	0,02	150+/-1	225+/-6	318+/-5

La clasificación de los panes indicó que todos eran de calidad similar (Cuadro 2).

## CUADRO 2

a-amilasa hongosa/a-amilasa bacterial u/g harina	1,1/0	0,27/0	0,27/0,02	0/0,02

## Cualidades externas (clasif. máxima)

Volumen	10	8,5	7,75	8,75	7,5
Simetría	5	4	7	4,25	4
Color de la corteza	10	8	8	8	8
Rotura y desmenuzamiento	5	4,25	4,25	4,25	4,25

## Cualidades externas

Grano	10	7,5	7,5	7,25	7,25
Textura	15	13	12,5	12,5	12,5
Color de la miga	10	9	9	9	9
Aroma	10	9	9	9	9
Sabor	15	13	13	13	13
Sensación en la boca	10	9	9	9	9

-17-

18

### EJEMPLO 2

Los ingredientes, fórmulas y procedimientos de ensayo fueron idénticos al ejemplo 1, excepto que en este caso el ablandador de miga (GMS-90) fue agregado solamente donde se indica.

En el ejemplo 2, las enzimas fueron de las mismas fuentes que en el Ejemplo 1; sin embargo, ambas enzimas fueron agregadas en forma de un polvo seco rociado. La relación y dosis de la alfa-amilasa hongosa a la alfa-amilasa bacterial fueron las que se encontraron óptimas en el ejemplo 1: 0,27 unidades de alfa-amilasa hongosa/g de harina: 0,02 unidades de alfa-amilasa bacterial/g de harina.

Los Cuadros 3 y 4 y la Figura 2 indican que la mezcla de enzimas solamente (sin el ablandador de miga) fue más efectiva que el ablandador de miga en reducir el régimen de endurecimiento del pan sin ningún efecto negativo en la calidad del mismo. La adición del ablandador de miga con la mezcla de enzimas dio un pequeño beneficio adicional.

### CUADRO 3

Adición de GMS-90	Adición de enzima	Firmeza de la miga Días después del horneado		
		Día 1	Día 4	Día 7
Ninguna	Ninguna	166+/-3	305+/-7	364+/-7
0,25%	Ninguna	155+/-4	259+/-8	337+/-6
Ninguna	Mezcla	123+/-2	206+/-4	292+/-6
0,25	Mezcla	121+/-3	204+/-3	286+/-7

-18-

10

39485

## CUADRO 4

		Ablandador de miga/Enzima			
		Ninguno/ ninguno	0,25% ninguno	Ninguno/ mezcla	0,25% mezcla
<b>Cualidades externas (clasif. máxima)</b>					
Volumen	10	7,25	8	9	8
Simetría	5	4	4,25	4	4
Color de la corteza	10	8	8	8	8
Rotura y desmenuzamiento	5	4,25	4,25	4,25	4,25
<b>Cualidades externas</b>					
Grano	10	7,5	7,5	7,5	7,5
Textura	15	12,75	12,75	12,75	12,75
Color de la miga	10	8,75	9	9	9
Aroma	10	9	9	9	9
Sabor	15	13	13	13	13
Sensación en la boca	10	9	9	9	9

Habiendo establecido la naturaleza general y algunos ejemplos de la invención, el alcance se establece ahora más particularmente en los títulos del apéndice.

12 SET 1991

-19-

20

39483

REIVINDICACIONES

1. Una composición para retardar el endurecimiento de productos de panadería horneados, CARACTERIZADA porque comprende una enzima de alfa-amilasa fúngica ácidoestable y una enzima alfa-amilasa bacterial, en una proporción de 5 a 100 unidades de alfa-amilasa de la enzima alfa-amilasa fúngica ácidoestable, y de 0,5 a 10 unidades de alfa-amilasa de la enzima alfa-amilasa bacterial.

2. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la enzima alfa-amilasa fúngica tiene una actividad óptima a un pH de entre 3,0 y 5,0 a una temperatura de entre 60 y 75°C.

3. La composición de la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque la enzima alfa-amilasa fúngica tiene una actividad óptima a un Ph de entre 5,0 y 7,0 a una temperatura de entre 100 y 110°C.

4. La composición de la reivindicación 3, CARACTERIZADA porque el hongo es el Aspergilli negro.

5. La composición de la reivindicación 4, CARACTERIZADA porque el Aspergilli negro es seleccionado de un grupo que consiste en Aspergillus awamori, Aspergillus usami, Aspergillus niger, Aspergillus saitoi, Aspergillus inui, Aspergillus aureus y Aspergillus nakazawai.

6. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la enzima alfa-amilasa bacterial está derivada del Bacillus stearothermophilus.

7. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la alfa-amilasa bacterial está derivada del Bacillus stearothermophilus.

8. La composición de la reivindicación 5, CARACTERIZADA porque la alfa-amilasa bacterial está derivada del Bacillus stearothermophilus. 39483

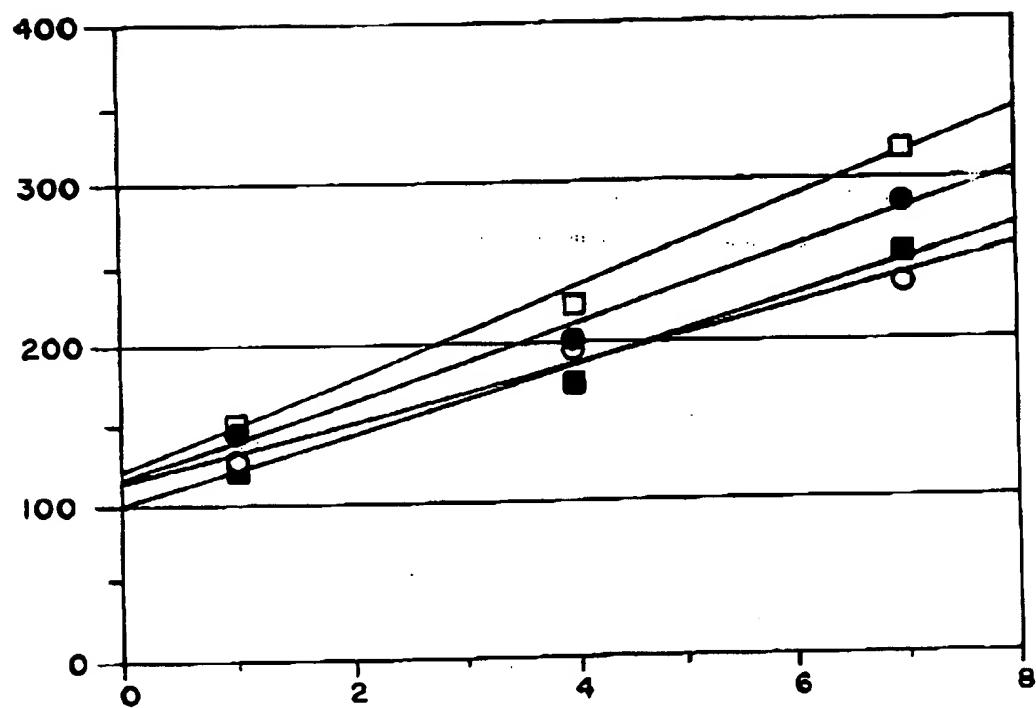
9. La composición de la reivindicación 8, CARACTERIZADA porque Aspergilli negro es Aspergillus niger.

pp.: ENZYME BIO-SYSTEMS LTD.

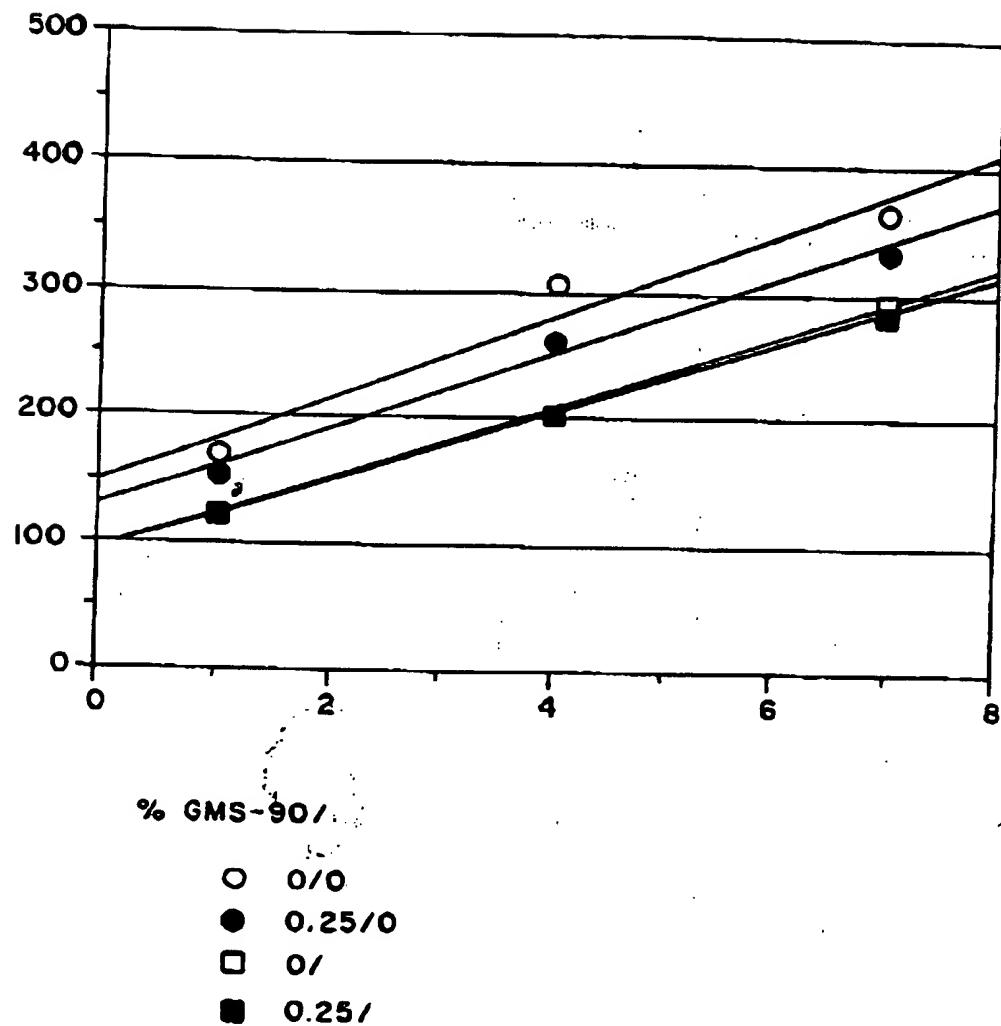
24

39483

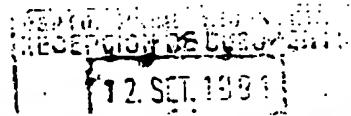
FIG. I



- 0/0.02
- 0.27/0
- 0.27/0.02
- 1.1/0

**FIG.2**

PP: ENZYME BIO-SYSTEMS LTD.



12 SET 1991